

# 大熊猫 (*Ailuropoda melanolenca*) 显带 染色体的研究

陈文元 王喜忠 王子淑 何光昕 叶志勇

(四川大学生物系 成都)

(成都市动物园)

关键词 大熊猫 显带染色体 珍稀动物

大熊猫系我国特产的世界珍稀动物,素有“活化石”和“国宝”之称。限于材料来源,虽有核型的少数报道(邓承宗等,1980;陈文元等,1984;Newnham *et al.*, 1986),但研究尚不够深入。1980年,Wurster-Hill 和 Bush首先报道了大熊猫( $\sigma^7$ )的显带核型,并与杂交熊等比较,探讨了大熊猫的分类地位。本文对四只大熊猫的G带、C带核型和Ag-NORs作了分析,绘制了G带核型模式图,并提出了某些商榷的意见。

## 材料和方法

### (一) 实验动物

大熊猫共4只(2 $\sigma^7$ , 2 $\phi^7$ ),均来自成都市动物园。

### (二) 血培养及染色体标本制备

外周血0.4—0.5毫升接种在人工培养基中[RPMI—1640 4毫升,小牛血清1毫升,ConA (sigma) 0.2毫克,肝素、抗菌素适量]。在38°C温箱中培养58小时。培养终止前6小时加秋水仙素,最终浓度为0.02微克/毫升。0.4% KCl溶液低渗,按常规空气干燥法制片。

### (三) 染色(四川大学生物系细胞研究室, 1984)

#### 1. G带

按Wang和Fedoroff (1972)方法,稍加改变。

1) 片龄2—7天的染色体标本制片,在37°C温箱内预处理3—24小时。

2) 在0.25%胰蛋白酶溶液[25毫克胰蛋白酶(川大生化教研室制品),溶于50毫升GKN溶液(1克葡萄糖,0.4克KCl, 8克NaCl, 0.35克NaHCO<sub>3</sub>, 加蒸馏水至1000

毫升), 50 毫升 Versene 溶液 (8 克  $\text{NaCl}$ , 0.2 克  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0.2 克  $\text{KCl}$ , 1.55 克  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 0.6 克  $\text{NaHCO}_3$ , 加蒸馏水至 1000 毫升)] 内处理 30—40 秒。

3) 在 GKN 溶液中漂洗 30 秒。

4) 2% Giemsa—0.067M 磷酸缓冲液 (pH6.8) 染色 10—15 分钟。

5) 自来水冲洗, 空气干燥, 镜检。

## 2. C 带

按 Sumner (1972) 方法改进。片龄 7 天左右的染色体标本制片, 按下列程序处理:

1) 5%  $\text{Ba}(\text{OH})_2$  溶液, 50°C 处理 10 分钟。

2) 0.1N HCl 漂洗。

3) 蒸馏水漂洗后, 以各级酒精脱水。

4) 65°C 2xSSC (0.3M 氯化钠 + 0.03M 柠檬酸三钠) 溶液处理 1 小时。

5) 0.067M 磷酸缓冲液 (pH6.8) 漂洗。

6) 1:40 Giemsa—磷酸缓冲液 (pH6.8) 染色 15—20 分钟。

7) 流水冲洗, 空气干燥, 镜检。

## 3. Ag—NORs

采用 Bloom (1976) 等人 Ag—I 方法稍加改进。在染色体标本制片上滴加 50% 的  $\text{AgNO}_3$  溶液数滴, 加盖片后放湿润密闭的培养皿内, 65°C 温箱中过夜。取出后流水冲洗, 再用 2% Giemsa—磷酸缓冲液 (pH6.8) 染色 1—2 分钟, 流水冲洗, 空气干燥, 镜检。

# 结 果

大熊猫二倍染色体数为  $2n=42$ , 其核型 (陈文元等, 1984) 包括 12 对中着丝粒染色体, 4 对亚中着丝粒染色体, 4 对近端着丝粒小染色体, 以及 2 个性染色体, X 染色体大小介于第 6—7 对染色体之间, 为亚中着丝粒染色体, Y 染色体比 No.18 染色体稍大, 为近端着丝粒染色体。

### (一) G 带核型 [图 1、2] (共分析四个个体 20 个细胞)

No.1 染色体 为中着丝粒染色体。短臂远侧有三条强带, 末端为一条中强带、中部有一条较宽的中强带, 近侧有一条较宽的强带, 一条阴性带, 近着丝粒处有一条窄的强带。长臂近侧有一条中强带, 两条强带, 中部有一条较宽的阴性带, 远侧有一条强带一条中强带, 在强带与中强带之间有一条阴性带。

No.2 染色体 为中着丝粒染色体。短臂中部有两条强带, 远侧有一条较宽的中强带, 近侧有一条中强带。长臂近侧有两条强带, 中部有两条中强带, 远侧有两条强带,

注: 图 1 中 XY 染色体来自另一个细胞。

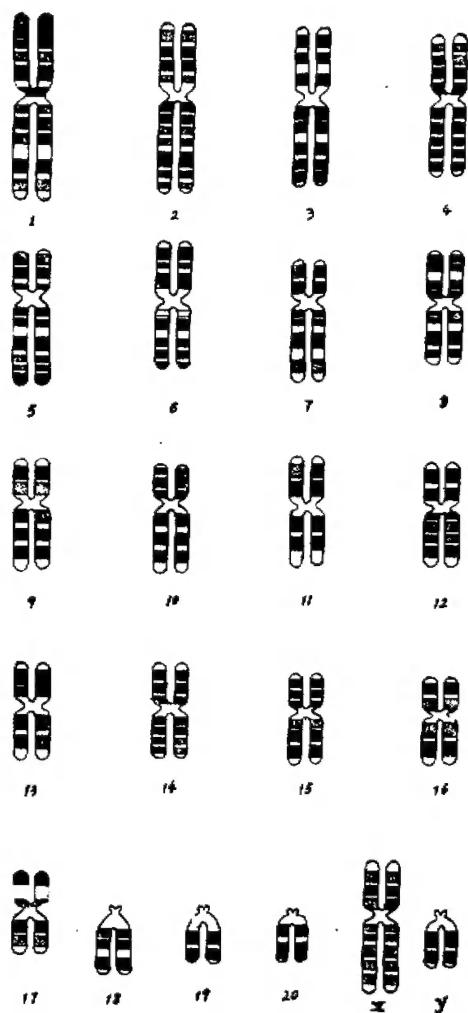


图 2 大熊猫 G 带模式图

Fig 2 G-banding idiogram of the giant panda

在两条强带之间有一条阴性带。

**No. 3 染色体** 为中着丝粒染色体。短臂有三条强带, 三条强带之间有两条阴性带。长臂近侧有两条强带, 中部有一条较宽的阴性带, 远侧有三条强带。

**No. 4 染色体** 为中着丝粒染色体。短臂近侧有两条强带, 远侧有两条中强带。长臂有五条分布较均匀的强带。

**No.5 染色体** 为亚中着丝粒染色体。短臂远侧有两条强带，近侧有一条较窄的强带。长臂近侧有两条窄的强带，中部有两条较宽的阴性带，两条阴性带之间有一条较宽的强带，远侧有两条中强带，末端为一条强带。

**No.6 染色体** 为中着丝粒染色体。短臂有两条较宽的强带，两个强带之间有一条中强带。长臂近侧有两条强带，中部有一条中强带，远侧有三条强带。

**No.7 染色体** 为亚中着丝粒染色体。短臂有两条较宽的强带。长臂近侧有两条较窄的强带，中部有两条阴性带，两条阴性带之间有一条较宽的强带，远侧有两条窄的强带。

**No.8 染色体** 为中着丝粒染色体。短臂近侧有两条强带，远侧有两条强带，中部为一条阴性带。长臂近侧有两条窄的强带，中部有一条阴性带，远侧有一条较宽的强带和一条中强带。

**No.9 染色体** 为亚中着丝粒染色体。短臂近侧有一条较宽的中强带，远侧有一条宽的强带。长臂有三条强带，三条强带之间有三条阴性带。

**No.10 染色体** 为亚中着丝粒染色体。短臂中部有一条强带，近侧和远侧各有一条中强带。长臂三条强带，三条强带之间有两条阴性带。

**No.11 染色体** 为中着丝粒染色体。短臂远侧有一条中强带，近侧有一条强带。长臂有两条强带，两条强带之间有一条阴性带。

**No.12 染色体** 为中着丝粒染色体。短臂有两条强带，两条强带之间为一条阴性带。长臂近着丝粒处有一条强带，中部有两条中强带，远侧有一条较宽的强带。

**No.13 染色体** 为中着丝粒染色体。短臂远侧有一条较宽的强带，中部有一条窄的阴性带，近侧有一条强带。长臂近侧有一条较宽的强带，中部有一条较宽的阴性带，远侧有一条强带。

**No.14 染色体** 为中着丝粒染色体。短臂中部和远侧有两条强带，近侧有一条中强带。长臂近侧有两条强带，远侧有两条中强带。

**No.15 染色体** 为中着丝粒染色体。短臂中部和近侧有两条强带，近侧有一条中强带。长臂近侧有一条中强带，中部和远侧有两条强带。

**No.16 染色体** 为中着丝粒染色体。短臂远侧有一条较宽的强带，近侧有一条中强带。长臂近侧有一条较宽的中强带，远侧有一条较宽的强带。

**No.17 染色体** 为近端着丝粒染色体。短臂近侧有一条窄的强带，具有大的次缢痕和随体。长臂近侧为一条宽的强带，远侧为一条中强带。

**No.18 染色体** 为近端着丝粒染色体。有时可见微小短臂。长臂近侧有两条强带，远侧有一条强带，中部有一条窄的阴性带。

**No.19 染色体** 为近端着丝粒染色体。有时可见微小短臂。长臂有两条强带。

**No.20 染色体** 为近端着丝粒染色体。有时可见微小短臂。长臂近侧有一条强带，远侧有一条较宽的强带。

**X 染色体** 为亚中着丝粒染色体。短臂近侧和远侧各为一条中强带，中部有一条强带。长臂近侧有一条中强带和一条强带，中部和远侧有三条中强带。

**Y 染色体** 为近端着丝粒染色体。可见微小短臂。长臂有两条强带。

## (二) C带核型 (分析了四个个体的23个细胞)

如图3所示, 大熊猫的42条染色体均显示着丝粒C带, 其中No.17的染色体C带最显著。Y染色体C带区域广泛十分显著, 几乎占据整个长臂。

大熊猫13分裂相 (5♀♀, 8♂♂) 的相对长度和着丝粒指数。

染色体号数	相对长度 $\pm$ S.E.	着丝粒指数 $\pm$ S.E.
1	$8.04 \pm 0.085$	$46.95 \pm 0.629$
2	$7.66 \pm 0.163$	$43.41 \pm 0.704$
3	$6.62 \pm 0.127$	$45.12 \pm 0.680$
4	$6.12 \pm 0.110$	$42.47 \pm 1.186$
5	$5.85 \pm 0.108$	$31.84 \pm 0.846$
6	$5.77 \pm 0.081$	$44.97 \pm 1.045$
7	$5.47 \pm 0.107$	$32.22 \pm 0.783$
8	$5.22 \pm 0.121$	$40.88 \pm 1.006$
9	$4.92 \pm 0.101$	$36.03 \pm 0.693$
10	$4.92 \pm 0.069$	$43.02 \pm 1.394$
11	$4.62 \pm 0.082$	$45.12 \pm 0.915$
12	$4.44 \pm 0.089$	$37.84 \pm 1.173$
13	$4.36 \pm 0.074$	$40.80 \pm 1.007$
14	$4.14 \pm 0.060$	$45.44 \pm 1.082$
15	$3.90 \pm 0.074$	$41.81 \pm 1.059$
16	$3.76 \pm 0.058$	$45.98 \pm 0.731$
17	$3.54 \pm 0.150$	
18	$2.13 \pm 0.047$	
19	$1.90 \pm 0.047$	
20	$1.79 \pm 0.036$	
$\Sigma$	$5.51 \pm 0.083$	$40.36 \pm 0.606$

## (三) Ag—NORs

Ag—NORs 在雌雄个体均定位在No.17对染色体的次缢痕区, 在两性个体之间无明显差异, 所以在分析结果时未区分性别。统计四只个体58个细胞, 显示一个 Ag—NORs 者有27个细胞[图4 A], 占46.6%; 显示2个 Ag—NORs 者有31个细胞[图4 B], 占53.4%。在58个细胞中发生随体联合者有8个[图4 C], 占14%。间期核显示的 Ag—NORs 数目与中期相显示的 Ag—NORs 有平行的关系。

实验中观察到在有丝分裂后期具有 Ag—NORs 的染色体着丝粒晚分离的现象[图4 D]。

## 讨 论

(一) 根据四只个体20个细胞G带染色体分析, 和 Wurster—Hill (1980) 等人所报告结果不同的是: No.16染色体并不表现出总是模糊不清的显带形态。包括Y染色体在内, 所有21对染色体均能显示比较清晰而且恒定的G带核型, 重复性较好。

(二) C带技术是显示染色体结构异染色质区的主要方法之一。根据C带核型研究, 发现大熊猫的结构异染色质主要表现为着丝粒区异染色质, 虽然其含量较少, 但只要实验条件合适, 每条染色体均可显示着丝粒C带, 其中No.17对染色体具次缢痕和随体, 被称为大熊猫核型的标志染色体, 与其他染色体相比, 标志染色体着丝粒C带明显, 说明富含异染色质。上述结果, 并不像 Wurster—Hill 等人所称C带仅存在于No. 2、7、9、11、15、17、18和20等八对染色体的着丝粒区。此外, 与 Wurster—Hill 等人结果相反, Y染色体长臂同样表现出明显的异染色质化。

一般认为, 在生物进化过程中, 结构异染色质是一种能促进核型进化的遗传结构。因为它不含有结构基因, 所以在核型进化过程中, 结构异染色质区允许发生染色体重排而又不严重危害其生物个体。大熊猫染色体的结构异染色质含量少, 且分布基本局限于着丝粒区, 这可能正是大熊猫在食肉目动物的进化中, 非常保守, 独居一科 (Ailuropodidae), 分布狭窄, 被称为“活化石”的遗传根据之一。

(三) 银染技术是特异显示 NORs 的有效方法之一, Ag—NORs 不仅反映了 rRNA 基因的染色体定位, 而且它的染色变异性还反映了间期核 rRNA 基因活性的差别。统计分析四只个体的58个细胞, 发现 Ag—NORs 在不同个体间及同一个体不同细胞间表现出数目上的多态现象, 有大约14%的细胞可见Ag—NOR融合在一起, 这直接证明了No.17对染色体时而发生随体联合现象。

此外, 在有丝分裂后期相所观察到的标志染色体着丝粒迟分离的情况, 这与其他动物 (包括人在内), 如中国仓鼠、普通鼯 (有袋类)、潮蛙以及人等所见到的情况相似 (Vig, 1984), 说明一个染色体组中, 其后期染色体的着丝粒分离是非随机的、有顺序的、在遗传上是受控制的。

## 参 考 文 献

- 邓承宗等 1980 自然杂志 9:720—721  
陈文元等 1984 大熊猫论文集 四川科技出版社 待发表  
Newham, R. E. and Davidson, W. M. 1966 *Cytogenetics* 5:153—163  
Vig, B. K. 1984 *Hum. Genet.* 68:239—243  
Wurster-Hill, D. H. and Bush, M. 1980 *Cytogenet. Cell Genet.* 27:147—154  
四川大学生物系细胞研究室 1984 动物学研究 5(1)增刊, 13—23

## STUDY ON THE BANDED CHROMOSOMES OF THE GIANT PANDA (*Ailuropoda melanolenca*)

Chen Wen yuan    Wang Xizhong    Wang Zishu

(Department of Biology, Sichuan University chengdu)

He Guangxin    Ye Zhiyong

(Zoological Garden of Chengdu)

The banded chromosomes G-banding, C-banding and Ag-staining technique of the giant panda (*Ailuropoda melanolenca*) have been studied. The results are as follows,

1. The diploid chromosome number is 42 in the giant panda. The distinctive G-banding patterns are clearly discernible in almost every chromosome. The banded idiogram based on the analysis of the banded chromosomes has been determined.

2. There is little heterochromatin revealed by C-banding. All the chromosomes have centromeric heterochromatin. The maker chromosomes (No. 17) have well-developed C bands showing the most prominent heterochromatin.

3. In the karyotype of the giant panda, Ag-NORs is the only the secondary constitution of the maker chromosomes. The number of Ag-NORs varies among the different individuals or metaphase analyzed. The satellite association has been demonstrated based on the fusion of Ag-NORs. Besides, later separation of centromere was noticed in the maker chromosomes during anaphase of mitosis.

**Key words** *Ailuropoda melanolenca* Banded chromosomes Rare animals

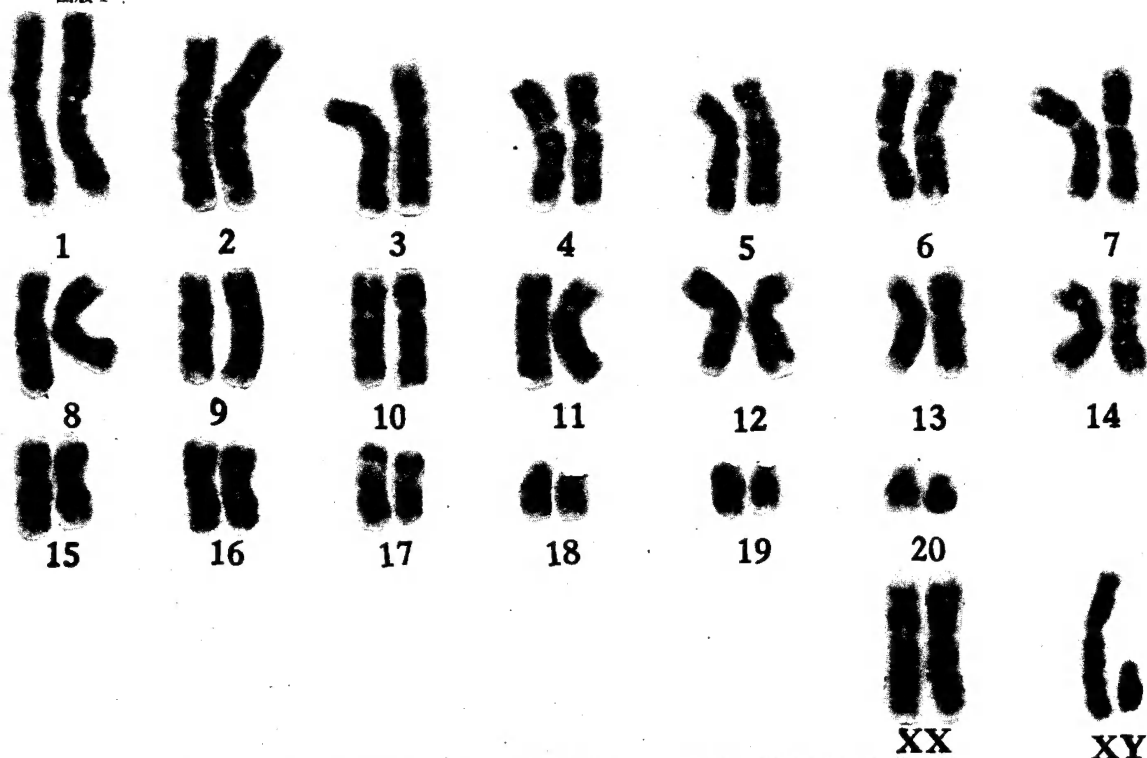


图1 雌性大熊猫G带核型 (XY染色体来自另一雄性个体)

Fig 1 G-banding karyotype of female giant panda (XY Chromosome from another male individual)



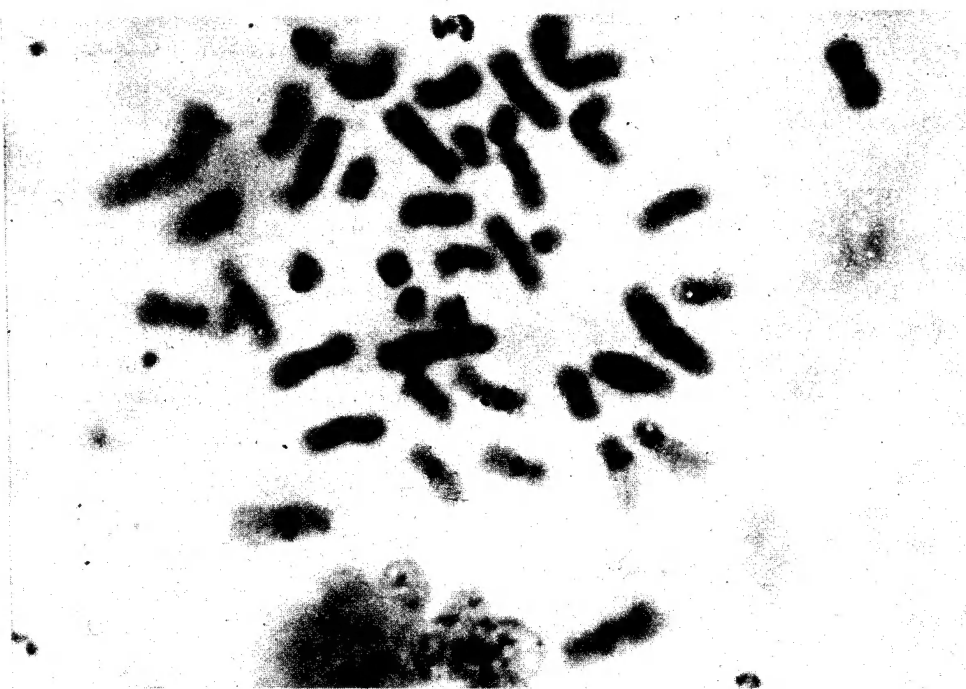
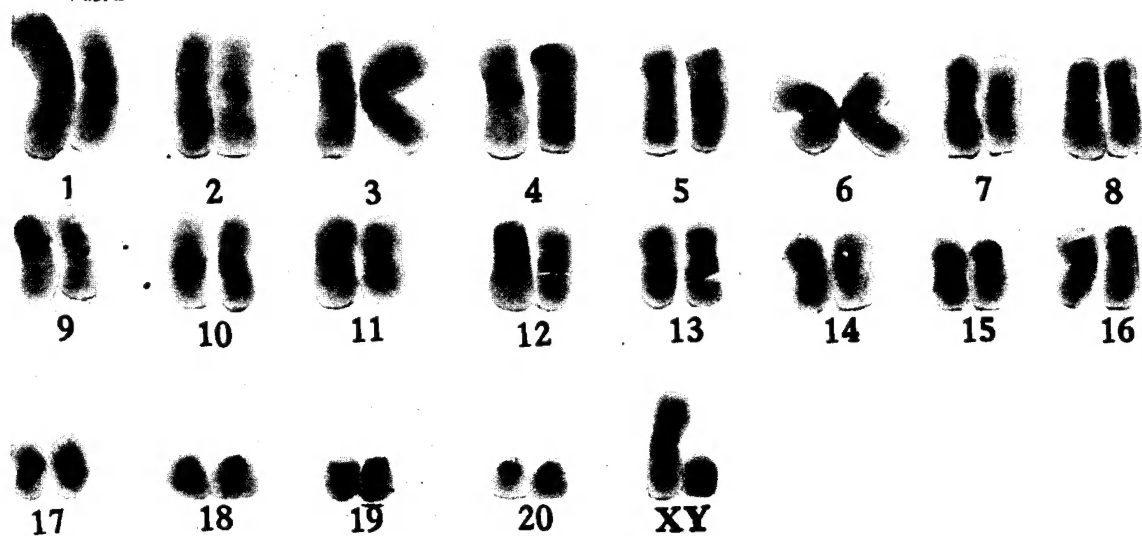


图3 雄性大熊猫C带核型

图版 I

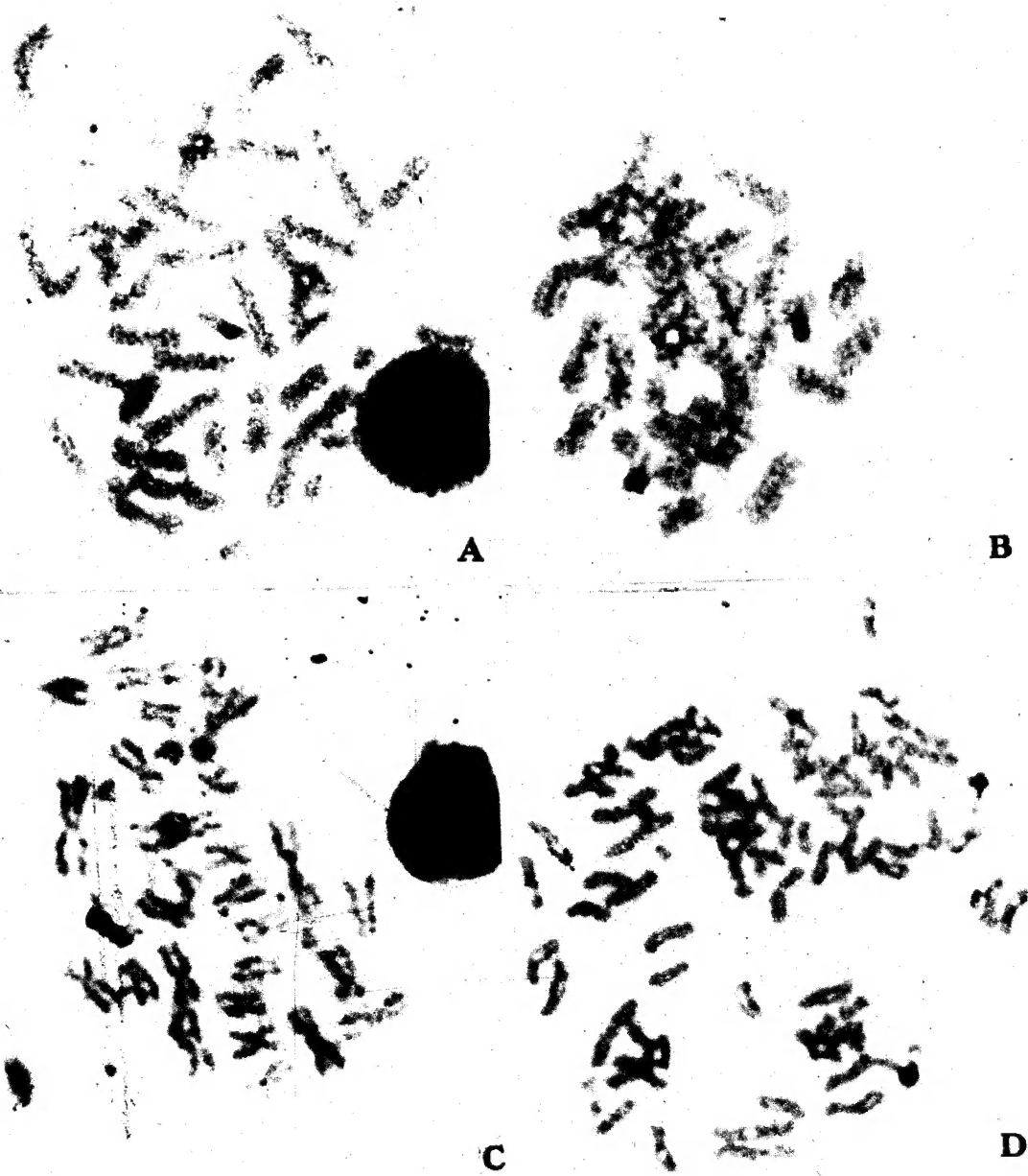


图4 大熊猫银染核仁组成区

Silver-stained NOR of the giant panda

A 中期相显示一个Ag-NOR

A metaphase plate showing one Ag-NOR

B 中期相显示二个Ag-NORs

B metaphase plate showing two Ag-NORs

C 中期相显示随体联合

C metaphase plate showing satellite association

D 17号染色体具Ag-NORs 显示迟分离

D No. 17 Chromosomes with Ag-NORs showing later separation